

Regulation of the Tumor Necrosis Factor Receptor-1 signaling by palmitoylation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Philipp Zingler

Kiel

2019

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Axel Scheidig
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Stefan Schütze
Tag der mündlichen Prüfung:	11. Februar 2019

Summary

The cytokine Tumor Necrosis Factor (TNF) is a pleiotropic mediator responsible for multiple biological outcomes in the organism ranging from cell expansion, differentiation and regeneration to inflammation and cell destruction. The main receptor transducing the external signal into the cell is the Tumor Necrosis Factor Receptor-1 (TNF-R1). Ligand binding either causes cell survival or cell death. The decision between these diametrically opposed effects is regulated by multiple posttranslational modifications of TNF-R1. In this thesis, a yet unknown posttranslational modification of TNF-R1 was identified that regulates the outcome of receptor engagement by affecting its subcellular localization within biological membranes. Dynamic S-acylation controls the selective signaling of TNF, leading either to receptor retention in discrete plasma membrane microdomains promoting cell survival or to receptor internalization associated with increased cell death.

In the first part of the thesis, the constitutive palmitoylation of TNF-R1 was identified and respective palmitoylation sites were defined using TNF-R1-deficient U937 and HeLa80 cells generated by the CRISPR/Cas9 method. Mutational analyses of putative palmitoylation sites in reconstituted U937 and HeLa80 cells revealed that TNF-R1 is triple-palmitoylated at cysteines C223, C248 and C304. However, the mutation of palmitoylation site C248 already changed the signaling outcome of TNF-R1 regarding cell death induction or NF- κ B activation. A C248S exchange resulted in an altered subcellular localization and reduced receptor expression on the cell surface.

In the second part, the protein thioesterase (PTE) APT2 was identified as the depalmitoylase for TNF-R1 after TNF stimulation. Pharmacological inhibition of APT2 altered the internalization and subcellular translocation of TNF-R1 and thus increased cell death induction and reduced NF- κ B activation. Mechanistically, APT2 inhibition trapped TNF-R1 at the plasma membrane which resulted in an increase of apoptosis due to the production of ceramide mediated by the neutral sphingomyelinase (nSMase).

Third, palmitoylated proteins in TNF signaling were investigated. It turned out that the protein acyltransferase (PAT) zDHHC5 is involved in the intracellular maturation, transport and apoptosis-induction of TNF-receptosomes after receptor internalization. Interestingly, also TNF-R2, the second cellular receptor for TNF displays a palmitoylation upon TNF stimulation.

Zusammenfassung

Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) ist ein pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin, welches von Zellteilung und -regeneration bis hin zu Entzündungen und Zelltod zahlreiche biologische Prozesse im Organismus reguliert. Der Rezeptor, der Signalweiterleitung ins Zellinnere vermittelt, ist der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-1 (TNF-R1), der je nach Komposition der Signalkomplexe entweder das Überleben der Zellen fördert oder deren Tod durch Apoptose einleitet. Die Entscheidung zwischen diesen beiden entgegengesetzten Effekten wird letztendlich bereits durch mehrere posttranslationale Modifikationen am Rezeptor reguliert.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine posttranslationale Modifikation charakterisiert werden, die die TNF-R1-Signaltransduktion über die subzelluläre Lokalisation in der Plasmamembran reguliert. Eine dynamische S-Acylierung steuert dabei die von TNF ausgelösten Ereignisse in der Zelle. Über eine Retention des Rezeptors in speziellen Plasmamembran-Mikrodomänen wird das Überlebenssignal weitergeleitet. Wird der Rezeptor dagegen internalisiert, wird der Zelltod eingeleitet.

Im ersten Teil der Arbeit konnte die konstitutive Palmitoylierung von TNF-R1 mit den entsprechenden Palmitoylierungsstellen in mittels CRISPR/Cas9 Technologie erzeugten TNF-R1-defizienten U937- und HeLa80 Zellen nachgewiesen werden. Mutationsanalysen der mutmaßlichen Palmitoylierungsstellen in rekonstituierten U937- und HeLa80-Zellen ergaben, dass TNF-R1 an den Cysteinen C223, C248 und C304 dreifach palmitoyliert vorliegt. Eine C248S Mutation änderte die TNF-R1 induzierte Signaltransduktion hinsichtlich der Zelltodinduktion oder der NF- κ B-Aktivierung. Mechanistisch änderte sich die subzelluläre Lokalisation des TNF-R1 einhergehend mit einer Verringerung der Rezeptordichte an der Zelloberfläche.

Im zweiten Teil konnte gezeigt werden, dass die Protein-Thioesterase (PTE) APT2 nach TNF-Stimulation die Depalmitoylierung von TNF-R1 katalysiert. Die Hemmung von APT2 veränderte die Rezeptor-Internalisierung und die subzelluläre Translokation und ebenfalls die TNF-R1-Signaltransduktion hinsichtlich Zelltodinduktion oder NF- κ B-Aktivierung. Aktivierter TNF-R1 verbleibt bei Hemmung von APT2 an der Plasmamembran, was in diesem experimentellen Setting zu einer Zunahme der Apoptose führt. Mechanistisch katalysiert die TNF-induzierbare neutrale Sphingomyelinase (nSMase) die Produktion des pro-apoptotischen Neutrallipids Ceramid an der Zellmembran.

Außerdem wurden weitere palmitoylierte Proteine in der TNF-Signalkaskade identifiziert. So ist die Protein-Acyltransferase (PAT) zDHH5 nach Rezeptor-Internalisierung an der intrazellulären Reifung, dem Transport von TNF-Rezeptosomen und der Apoptose-Induktion nach Rezeptor-Internalisierung beteiligt. Darüber hinaus konnte auch für TNF-R2, dem zweiten Rezeptor für TNF, eine Palmitoylierung nach TNF-Stimulation nachgewiesen werden.